

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: Kazuhisa FUKUSHIMA, et al.

Serial Number: Not Yet Assigned

Filed: December 5, 2003

Customer No.: 38834

For: BIOPOLYMER DETECTING METHOD AND BIOCHIP

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119

Commissioner for Patents
P. O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

December 5, 2003

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application is hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

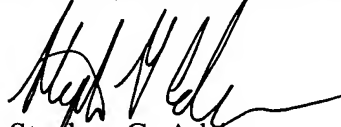
Japanese Appln. No. 2002-353559, filed on December 5, 2002

In support of this claim, the requisite certified copy of said original foreign application is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copy.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 50-2866.

Respectfully submitted,
WESTERMAN, HATTORI, DANIELS & ADRIAN, LLP


Stephen G. Adrian
Reg. No. 32,878

Atty. Docket No.: 032094
1250 Connecticut Ave, N.W., Suite 700
Washington, D.C. 20036
Tel: (202) 822-1100
Fax: (202) 822-1111
SGA/ll

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 2 月 5 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 5 3 5 5 9
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 2 - 3 5 3 5 5 9]

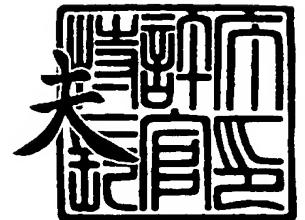
出 願 人 横 河 電 機 株 式 会 社
Applicant(s):



2 0 0 3 年 8 月 1 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 6 4 4 3 0

【書類名】 特許願

【整理番号】 02N0049

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/566

【発明者】

【住所又は居所】 東京都武蔵野市中町 2 丁目 9 番 3 2 号 横河電機株式会
社内

【氏名】 福島 和久

【特許出願人】

【識別番号】 000006507

【氏名又は名称】 横河電機株式会社

【代表者】 内田 勲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005326

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生体高分子検出方法およびバイオチップ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ターゲット生体高分子を基板側に捕捉してターゲット生体高分子を検出する生体高分子検出方法であって、

蛍光標識したターゲット生体高分子と、表面にプローブ生体高分子とビーズの ID 認識用のアドレスリンカーを固定したビーズとを溶液中に入れて、ターゲット生体高分子とプローブ生体高分子をハイブリダイズさせた後、基板上に固定の前記アドレスリンカーとは抗原・抗体の関係にあるアドレスプローブタンパク質で前記アドレスリンカーを抗原・抗体反応により捕捉することを特徴とする生体高分子検出方法。

【請求項 2】

前記アドレスリンカーは、前記ビーズの ID を認識するためのアドレス判定用抗原または抗体であることを特徴とする請求項 1 記載の生体高分子検出方法。

【請求項 3】

前記ターゲット生体高分子とビーズをバッファ溶液と共に容器中に入れ、物理的もしくは電氣的もしくは化学的手段により攪拌することを特徴とする請求項 1 または 2 記載の生体高分子検出方法。

【請求項 4】

前記ビーズとして磁気ビーズもしくは金属またはプラスチックを用いたビーズを使用したことを特徴とする請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の生体高分子検出方法。

【請求項 5】

前記ターゲット生体高分子は、DNA からの転写産物である RNA、または cDNA、またはタンパク質であることを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の生体高分子検出方法。

【請求項 6】

ハイブリダイゼーション法によりターゲット生体高分子と結合するプローブ生

体高分子と共にビーズ表面に固定されたID認識用のアドレスリンカーを、抗原・抗体反応により捕捉することのできるアドレスプローブタンパク質を基板上に固定しているバイオチップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNAやRNA（RNAはDNAからの転写産物、すなわちmRNAまたはrRNAまたはtRNAまたは低分子RNAである）、タンパク質などの生体高分子を検出する方法およびそれに用いられるバイオチップに関するものである。

【0002】

【従来の技術】

従来より、マイクロアレイチップを用いて生体高分子（以下DNAを例にとる）を解読する技術はよく知られている（例えば、特許文献1参照）。そして、この種のDNAのマイクロアレイチップは通常次のように形成され、DNAを解読することができるようになっている。

【0003】

ガラス（あるいはプラスチック）基板上に、ターゲットとなるmRNA（cDNA）と相補的配列をもつプローブDNAをアレー状にスポッティングして固定する。その上に、ターゲットとなるmRNA（cDNA）に蛍光ラベルを付けたものを滴下する。相補的配列同士のプローブとターゲットはハイブリダイズして結合するが、そうでないものは結合しない。

【0004】

十分ハイブリダイゼーションが進行した後、基板上をウォッシングバッファ液で洗浄し、ハイブリダイズしなかったターゲットを洗い流す。次に、読取装置で光学的に蛍光ラベルの位置および光量を読み取ることにより、ターゲットとなるmRNA（cDNA）の有無およびその量を測定することができる（例えば、特許文献2参照）。

【0005】

【特許文献1】

特開 2000-131237号公報（第2頁、図1-3）

【特許文献2】

特開 2000-235035号公報（第2頁、図7-9）

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、従来のDNAマイクロアレイは上記のような一連のプロトコルにより目的とするデータが得られるが、実際には各段階のプロトコル上で色々な問題点を抱えている。その結果、得られたデータには確かさ、再現性、繰り返し特性、感度などの課題が多く、それゆえ実験データの標準化が進まず、更にはコンテンツ面での問題点と相俟って臨床現場でDNAマイクロアレーが普及するには至っていない。

色々な問題点のうち特に問題となる項目は、S/N比、検出感度、検出時間、確からしさ、再現性である。

【0007】

本発明の目的は、上記の課題を解決するもので、S/N比の向上、検出感度の向上、検出時間の短縮を図った抗原抗体反応利用の生体高分子検出方法およびその方法に用いられるバイオチップを提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

このような目的を達成するために、請求項1の発明は、

ターゲット生体高分子を基板側に捕捉してターゲット生体高分子を検出する生体高分子検出方法であって、

蛍光標識したターゲット生体高分子と、表面にプローブ生体高分子とビーズのID認識用のアドレスリンカーを固定したビーズとを溶液中に入れて、ターゲット生体高分子とプローブ生体高分子をハイブリダイズさせた後、基板上に固定の前記アドレスリンカーとは抗原・抗体の関係にあるアドレスプローブタンパク質で前記アドレスリンカーを抗原・抗体反応により捕捉することを特徴とする。

【0009】

本発明ではビーズを使用しているため、ビーズの表面積は従来のDNAチップの

表面積に比べ格段に大きくなり、そのビーズ表面に沢山のプローブ生体高分子を固定することができ、これによりビーズ上のプローブ生体高分子と溶液中のターゲット生体高分子とが邂逅する機会が格段に高まり、ターゲット生体高分子を極めて高い感度で捕捉することができる。一般にDNAアレーの約 1 0 0 0 倍以上の感度である。

ビーズには、さらにID認識用のアドレスリンカーが固定されている。

一方、基板上のサイトにはアドレスリンカーと抗原・抗体の関係にあるアドレスプローブタンパク質が固定されている。基板に前記ビーズを注ぐと、抗原・抗体反応によりアドレスリンカーはアドレスプローブタンパク質に強力な結合力で捕捉される。

このようにして、高S/N比、高検出感度でターゲット生体高分子を基板上に捕捉することができる。

【 0 0 1 0 】

前記アドレスリンカーは、請求項 2 のように前記ビーズのIDを認識するためのアドレス判定用抗原または抗体である。

また、請求項 3 のように、ターゲット生体高分子とビーズをバッファ溶液と共に容器中に入れ、物理的もしくは電気的もしくは化学的手段により攪拌すると、従来方式が単にブラウン運動にて相補的プローブを探すことに比べ、本発明では他からのエネルギーを得て相補的プローブを探すことになるので、邂逅する機会が格段に高まり、その結果プローブ生体高分子とターゲット生体高分子のハイブリダイゼーションを高速化することができる。

【 0 0 1 1 】

ビーズとしては、請求項 4 のように磁気ビーズ、もしくは金属またはプラスチックを用いたビーズを使用する。また、ターゲット生体高分子は、請求項 5 のようにDNAからの転写産物であるRNA（mRNAまたはrRNAまたはtRNAまたは低分子RNA）、またはcDNA、またはタンパク質である。

【 0 0 1 2 】

請求項 6 の発明は、ハイブリダイゼーション法によりターゲット生体高分子と結合するプローブ生体高分子と共にビーズ表面に固定されたID認識用のアドレス

リンカーを、抗原・抗体反応により捕捉することのできるアドレスプローブタンパク質を基板上に固定していることを特徴とするバイオチップである。

【 0 0 1 3 】

【発明の実施の形態】

本発明では、ビーズの良いところとDNAアレーの良いところを組合わせている。ビーズの良いところは、表面積が大きいためプローブDNAを沢山結合しておくことができ（平板状のサイトにプローブDNAを結合するのに比して格段に多い）、しかも溶液中を自由に移動することができるので、溶液中のターゲット生体高分子と邂逅する機会が飛躍的に向上し、その結果溶液中の微量のターゲットDNAを極めて高い感度で捕捉することができる（一般にDNAアレーの約 1 0 0 0 倍以上である）点である。

【 0 0 1 4 】

しかしながら、一方で、各ビーズのIDすなわちどのビーズにどのDNAが結合したかが分らないという欠点がある。このビーズのIDを認識するため、通常、カラービーズを使ったり、2色の光源で識別したりと色々な試みがなされているが、識別できる数が少ないという問題と、装置が複雑化、高額化、大型化し、そして取り扱いが難しくなるという問題がある。本発明ではビーズ上とアレイ上のタンパク質の抗原・抗体反応により識別できるようにして、この問題をうまく解決している。

【 0 0 1 5 】

以下図面を用いて本発明を詳しく説明する。図 1 ないし図 3 は本発明に係る生体高分子検出方法の一例の原理を説明する図である。なお、ここでは、生体高分子がDNAである場合について説明する。

図 1 に示すように、ビーズ 1 の表面にプローブDNA 2 を固定する。ビーズとしては、磁気ビーズや金属もしくはプラスチックを用いたビーズなどが使用できる。

【 0 0 1 6 】

ビーズ 1 の表面には、それに加えてビーズの特定番号IDを認識するためのアドレスリンカー 3（アドレス判定用抗原もしくはアドレス判定用抗体）を固定する

。他方、ターゲットとなるRNAあるいはcDNAあるいはタンパク質（以下これらを代表してRNAという）4には、蛍光タグ5を標識する。

【0017】

前記ビーズ1とターゲットRNA4とバッファ溶液6を共に容器7中に入れ、必要に応じて物理的もしくは電氣的もしくは化学的手段によって攪拌する。この結果、ビーズ1表面のプロープDNA2には、これと相補的關係にあるターゲットRNA4が結合する。

【0018】

次に、前記結合したビーズを図2に示すバイオチップ10のアレイ状のサイト11上に注ぐ。なお、同図(a)は側面図、同図(b)は平面図である。

サイト11上には、ビーズ1表面のID認識用アドレスリンカー3を抗原・抗体反応により捕捉し、ビーズ1のIDを認識するためのアドレスプロープタンパク質12があらかじめ固定されている。なお、図3は図2の丸囲み部分Aの拡大図である。

【0019】

アドレスリンカー3とアドレスプロープタンパク質12は抗原・抗体反応により結合する。ビーズ1がどのプロープサイト11のアドレスプロープタンパク質12に結合したかは蛍光ラベル5によって認識することができる。蛍光ラベルは蛍光読取装置（図示せず）により容易に検出できる。

このようにしてターゲットRNA4の存在およびその量を効率よく測定することができる。

【0020】

なお、以上の説明は、本発明の説明および例示を目的として特定の好適な実施例を示したに過ぎない。したがって本発明は、上記実施例に限定されることなく、その本質から逸脱しない範囲で更に多くの変更、変形をも含むものである。

【0021】

【発明の効果】

以上説明したように本発明によれば次のような効果がある。

(1) ビーズは表面積が大きいため沢山のプロープDNAを結合でき、したがって

溶液中の微量のターゲット生体高分子を極めて高い感度（一般のDNAアレーの約1000倍以上の感度）で容易に捕捉することができる。

（2）1つのビーズに結合した沢山のプローブDNAにターゲットDNAをハイブリダイズさせ結合させ得るので、容易にS/N比を上げることができる。

（3）1つのビーズに沢山のプローブDNAを結合していることと、溶液を攪拌することにより、ターゲットDNAとプローブDNAとの邂逅の機会が多くなり、検出時間（主としてハイブリダイゼーションに要する時間）を容易に短縮することができると同時に、極めて高い感度でターゲットDNAとプローブDNAとをハイブリダイズさせることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明に係る生体高分子検出方法の一例の原理を説明する図である。

【図2】

本発明に係る生体高分子検出方法の一例の原理を説明する他の説明図である。

【図3】

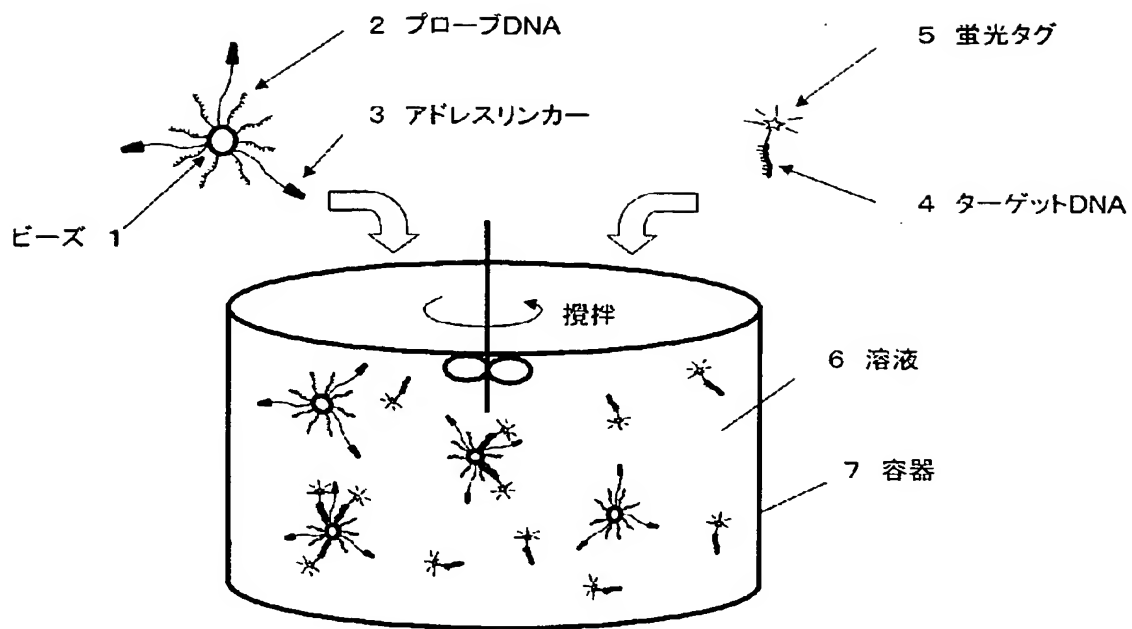
本発明に係る生体高分子検出方法の一例の原理を説明する他の説明図である。

【符号の説明】

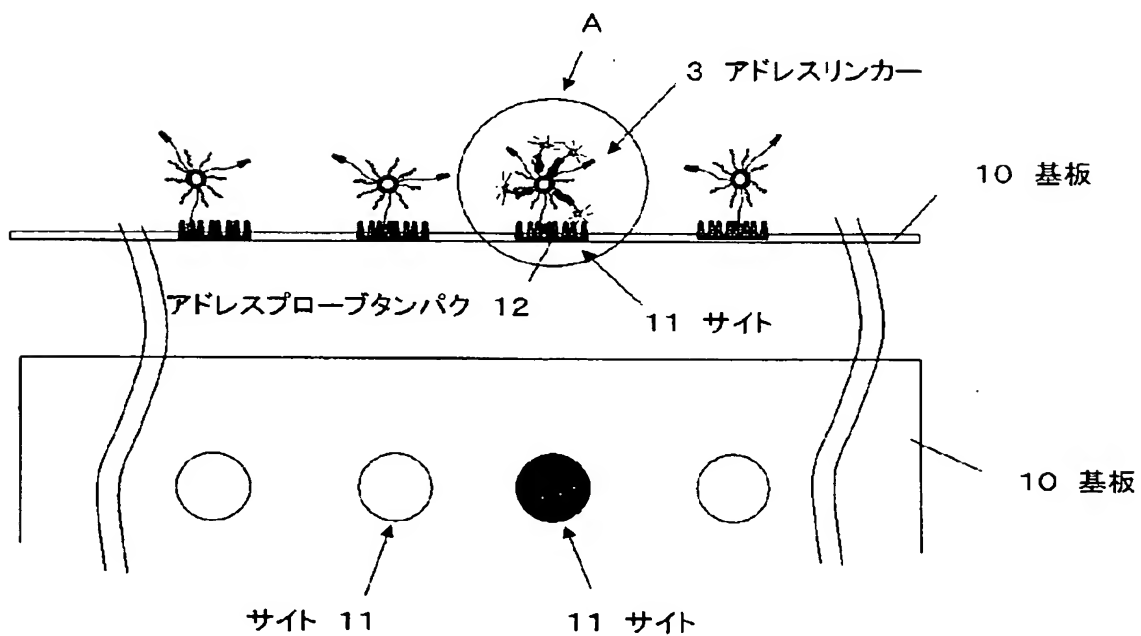
- 1 ビーズ
- 2 プローブタンパク
- 3 アドレスリンカー
- 4 ターゲットDNA
- 5 蛍光タグ
- 6 溶液
- 7 容器
- 10 基板
- 11 サイト
- 12 アドレスプローブタンパク

【書類名】 図面

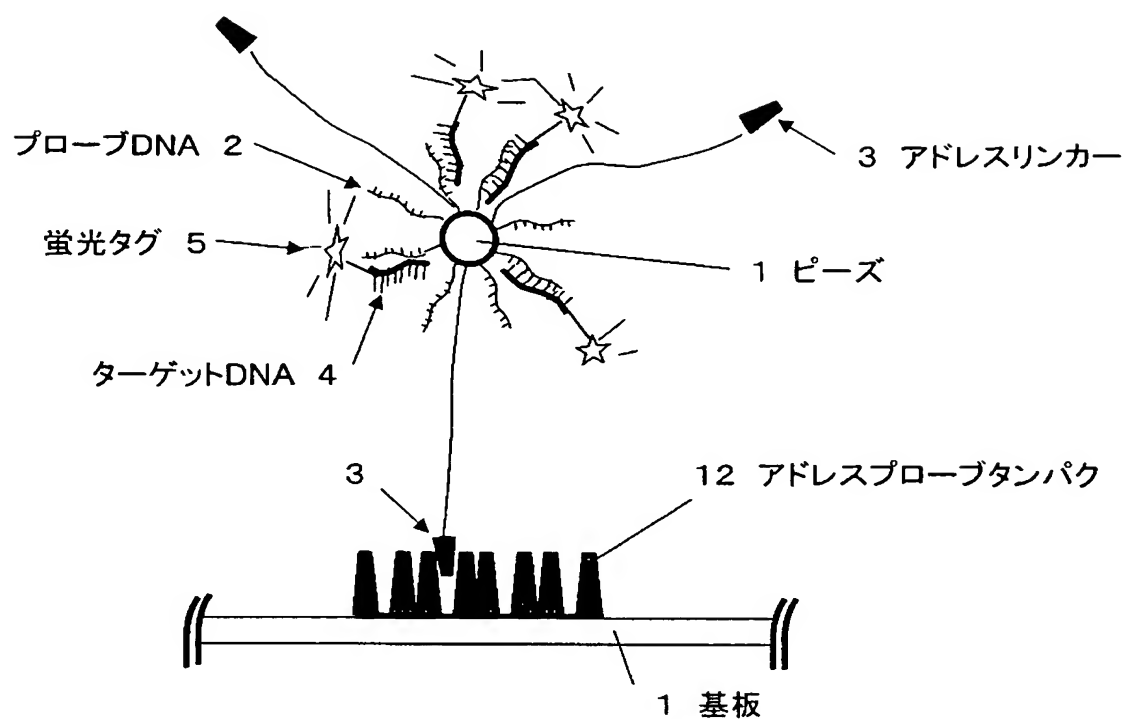
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 S/N比の向上、検出感度の向上、検出時間の短縮を図った抗原抗体反応利用の生体高分子検出方法およびバイオチップを提供する。

【解決手段】 ターゲット生体高分子を基板側に捕捉してターゲット生体高分子を検出する生体高分子検出方法であって、

蛍光標識したターゲット生体高分子と、表面にプローブ生体高分子とビーズのID認識用のアドレスリンカーを固定したビーズとを溶液中に入れて、ターゲット生体高分子とプローブ生体高分子をハイブリダイズさせた後、基板上に固定の前記アドレスリンカーとは抗原・抗体の関係にあるアドレスプローブタンパク質で前記アドレスリンカーを抗原・抗体反応により捕捉する。

【選択図】 図3

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 3 5 3 5 5 9
受付番号	5 0 2 0 1 8 4 2 3 1 5
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 4 年 1 2 月 1 2 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成14年12月 5日
-------	-------------

次頁無

【書類名】 手続補正書

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2002-353559

【補正をする者】

【識別番号】 000006507

【氏名又は名称】 横河電機株式会社

【代表者】 内田 勲

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県三島市谷田（遺伝学） 2 1 3 8 - 4 番地

【氏名】 嶋本 伸雄

【発明者】

【住所又は居所】 東京都武蔵野市中町 2 丁目 9 番 3 2 号 横河電機株式会社
社内

【氏名】 福島 和久

【プルーフの要否】 要



認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 3 5 3 5 5 9
受付番号	5 0 3 0 1 0 4 7 4 4 8
書類名	手続補正書
担当官	塩原 啓三 2 4 0 4
作成日	平成 1 5 年 8 月 4 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成15年 6月24日
-------	-------------

特願 2002-353559

出願人履歴情報

識別番号

[000006507]

1. 変更年月日

1990年 8月10日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都武蔵野市中町2丁目9番32号

氏名

横河電機株式会社